亚洲玉米螟 C 型凝集素 CTL6 的克隆和功能分析

沈东旭[1], 初　源[1], 洪　芳[1], 刘　杨[2], 王桂荣[2], 安春菊[1,*]

(1. 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193;
2. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要:【目的】鉴定出一种新的亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Guenée) C 型凝集素(C-type lectin),并对其功能进行初步研究。【方法】通过生物信息学分析,从亚洲玉米螟转录组中筛选得到一个可能的 C 型凝集素基因,命名为 *CTL6*。利用 RT-PCR 技术分析该基因在亚洲玉米螟不同龄期、不同组织及不同病原物诱导下的表达模式。借助原核及杆状病毒真核表达系统产生重组 CTL6 蛋白,并利用细菌凝集实验对其功能进行初步研究。【结果】*CTL6* 基因 cDNA 全长序列为 1 034 nt,其中完整开放阅读框为 945 nt。推导的 CTL6 多肽序列包括 314 个氨基酸残基,N 端含有由 22 个氨基酸残基组成的信号肽。CTL6 成熟肽中含有两个串联的糖识别结构域,与烟草天蛾 *Manduca sexta* 的 IML-2 (Immulectin-2)同源性最高。RT-PCR 结果显示,*CTL6* 在亚洲玉米螟 5 龄幼虫期转录水平最高,卵期其次,不同组织中则是在脂肪体中转录水平最高,呈诱导性表达。纯化的 CTL6 重组蛋白对大肠杆菌 *Escherichia coli* 具有一定的凝集作用。【结论】鉴定到的亚洲玉米螟 CTL6 是一种典型的 C 型凝集素,重组 CTL6 蛋白可能参与了亚洲玉米螟对病原菌的凝集作用。

关键词: 亚洲玉米螟; C 型凝集素; CTL6; 天然免疫反应; 凝集作用
中图分类号: Q966　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0454-6296(2015)11-1177-09

Molecular cloning and functional analysis of C-type lectin 6 (CTL6) in *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae)

SHEN Dong-Xu[1], CHU Yuan[1], HONG Fang[1], LIU Yang[2], WANG Gui-Rong[2], AN Chun-Ju[1,*]
(1. College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Disease and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract:【Aim】This study aims to identify a C-type lectin in *Ostrinia furnacalis* (Guenée) and to investigate its function.【Methods】A potential C-type lectin gene was identified from *O. furnacalis* transcriptome with bioinformatics analysis and designated as *CTL6*. Its expression profiles in different developmental stages and tissues and after different pathogen induction in this insect were analyzed with RT-PCR. The recombinant CTL6 protein was produced in the prokaryotic or baculovirus eukaryotic expression system, and its function was investigated preliminarily with bacterial agglutination assay.【Results】The full-length cDNA of *CTL6* is 1 034 nt, with an open reading frame of 945 nt. The deduced protein consists of 314 amino acid residues, including a predicted 22-residue secretion signal peptide. The mature CTL6 peptide contains two carbohydrate recognition domains. Database search indicated that *O. furnacalis* CTL6 has the highest amino acid sequence identity to IML-2 (Immulectin-2) from *Manduca sexta*. RT-PCR results showed that *CTL6* was transcribed at the highest level in the 5th instar larval stage, followed by the egg stage, and its expression level in the fat body was the highest among the tested tissues. *CTL6* mRNA level obviously increased after bacterial or fungal injection. Agglutination assay revealed that the purified CTL6 recombinant protein played a role in the agglutination of *Escherichia coli*.【Conclusion】The identified *O. furnacalis* CTL6 is a typical C-type lectin, which may be involved in the agglutination response of *O. furnacalis* against pathogens.

Key words: *Ostrinia furnacalis*; C-type lectin; CTL6; innate immune response; agglutination response

---

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201578, 31172090)
作者简介: 沈东旭, 男, 1991 年 3 月生, 河北承德人, 博士研究生, 研究方向为昆虫天然免疫反应, E-mail: shendongxu0311@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: anchunju@cau.edu.cn
收稿日期 Received: 2015-06-01; 接受日期 Accepted: 2015-10-09

一般认为,昆虫缺乏高等动物所具有的获得性免疫系统,主要依赖自身高效的天然免疫系统抵御不同外源病原物的侵染并成功繁衍生息(Jiang *et al*., 2010; 张明明等, 2012; Kingsolver and Hardy, 2012)。外源病原物入侵后,昆虫必须首先能够识别"异己"分子,进而快速启动体内的天然免疫反应,并产生各种效应分子来杀灭、清除外源物。昆虫对外源病原物的识别主要通过昆虫体内的模式识别蛋白受体(pattern recognition protein receptors, PRPs)识别并结合病原物表面特有的病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)来实现的(Cherry and Silverman, 2006; Hughes, 2012)。C 型凝集素(C-type lectin),又称免疫凝集素,是一种重要的昆虫模式识别蛋白受体,含有一个或两个糖识别结构域(carbohydrate recognition domain, CRD),通过识别外源病原物来参与昆虫的天然免疫反应。迄今为止,在烟草天蛾 *Manduca sexta*、家蚕 *Bombyx mori*、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 和黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中已鉴定出 C 型凝集素(Haq *et al*., 1996; Koizumi *et al*., 1999; Yu *et al*., 1999; Chai *et al*., 2008)。研究表明,C 型凝集素可特异性地识别细菌表面的脂多糖或脂磷壁酸并与之结合,从而引起细菌、真菌等微生物的凝集(Takase *et al*., 2009; Jin *et al*., 2013)。此外,C 型凝集素还可以促进酚氧化酶原的激活,导致黑色素在病原物表面的沉积(Yu and Kanost, 2004; Ling and Yu, 2006; 宁媛媛等, 2009)。例如:果蝇 C 型凝集素 DL1(*Drosophila* C-type lectins 1)能与革兰氏阴性细菌大肠杆菌 *Escherichia coli* 结合(Tanji *et al*., 2006),果蝇 C 型凝集素 DL2 和 DL3 可在 Ca^{2+} 存在的情况下使大肠杆菌凝集。DL2 和 DL3 还参与了黑化作用和淋巴细胞的吞噬作用(Ao *et al*., 2007)。家蚕淋巴液中的 BmMBP (*Bombyx mori* multibinding protein)含有两个串联的糖识别结构域,可以识别并结合多种革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌和酵母 *Saccharomyces cerevisiae*,并在体内促进淋巴细胞的集结作用(Watanabe *et al*., 2006)。

目前,关于 C 型凝集素的功能在烟草天蛾中研究得最为充分,共发现了 4 种烟草天蛾 C 型凝集素,即免疫凝集素 1 至 4(immulectin-1 to 4, IML-1, IML-2, IML-3 和 IML-4)(Yu *et al*., 1999; Yu, 2000; Yu *et al*., 2005; Ling and Yu, 2006; Yu and Ma, 2006; Yu *et al*., 2006)。其中 IML-2 的转录水平在烟草天蛾受到革兰氏阴性菌侵染后会明显上升,重组 IML-2 蛋白可专一性地与革兰氏阴性菌结合,参与了烟草天蛾对革兰氏阴性菌的清除以及增强淋巴细胞的包囊和黑化作用(Yu, 2000; Jiang, 2003; Yu and Kanost, 2004)。

亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Guenée)是一种重要的农业害虫,属鳞翅目螟蛾科。通过 Illumina 测序技术得到了亚洲玉米螟的转录组数据,分析显示存在 14 个潜在的 C 型凝集素基因(Liu *et al*, 2014)。其中命名为 *CTL6* 的基因与烟草天蛾 *IML-2* 有最高的同源性。本研究表明 *CTL6* 编码的多肽具有鳞翅目昆虫 C 型凝集素的典型特征。*CTL6* 在亚洲玉米螟 5 龄幼虫期的转录水平最高,卵期其次,不同组织中则是在脂肪体中转录水平最高,且细菌或真菌侵染后 *CTL6* 的转录水平均明显增加。真核表达系统来源的 CTL6 重组蛋白对大肠杆菌具有一定的凝集作用。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

实验所用的亚洲玉米螟采用半人工饲料(宋彦英等,1999)在人工气候培养箱(GXZ-500B 光照培养箱,宁波江南仪器厂)中饲养(28℃,相对湿度 70% ~90%,光周期为 16L∶8D),并根据其蜕皮次数和头壳宽度来鉴定其龄期。该实验所用的球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 在马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基上培养(28℃,相对湿度 80%),接种后 3 -4 周收集孢子并悬浮,稀释至终浓度为 2×10^5 个/μL 备用。

1.2 供试主要试剂

TRNzol Reagent 提取试剂盒、TIANScript cDNA 第一链合成试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司;细胞转染试剂 Cellfectin II Reagent (Invitrogen)、无血清昆虫培养基(Lonza)和 Ni-NTA Agarose (QIAGEN)购自北京泽平科技有限公司。其他试剂为国内分析纯。

1.3 亚洲玉米螟 *CTL6* 基因的克隆

向亚洲玉米螟 5 龄第 0 天尚未取食的幼虫体内注射 3 μL 孢子悬浮液(2×10^5 个/μL),10 h 后,按照天根生化科技(北京)有限公司 TRNzol Reagent 提取试剂盒说明书提取幼虫总 RNA,并按照 TIANScript cDNA 第一链合成试剂盒说明书合成 cDNA。根据亚洲玉米螟转录组数据(Liu *et al*., 2014)设计引物(表 1),通过 PCR 扩增获得 *CTL6* 全长序列。PCR 扩增反应条件为:94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,38 个循环;72℃延伸 10 min。

1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物后，切胶回收得到目的片段，并进一步将目的片段连接到 pMD19-T 载体，筛选阳性克隆菌株并送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序，进而获得 *CTL6* 的完整编码序列。

表 1　基因克隆、RT-PCR 及构建表达载体所用的引物序列

Table 1　Nucleotide sequences of primes used in gene cloning, RT-PCR and construction of expression vectors

引物名称 Primer name	引物序列(5′-3′) Primer sequences	引物用途 Use of primers
CTL6-F	CTGCAACGATGCAGACCGTTG	cDNA 克隆 cDNA cloning
CTL6-R	TTCAATGCTCATCATCACACATC	
qCTL6-F	TGTGGTACTACTGATCCTGA	RT-PCR
qCTL6-R	TTTCAATGCTCATCATCACAC	
rpL8-F	AAGCGAGGAACATCAGCC	
rpL8-R	GGTCTTGCCACCACGAAT	
pCTL6-F	CATCATCATCATCACCGTCAGTTCAGA	原核表达 Prokaryotic expression
pCTL6-F1	ATCCATGGGCCATCATCATCATCATCAC	
pCTL6-R	ATGCGGCCGCTTTCAATGCTCATCATCACAC	
eCTL6-F	TAGGATCCAAACTGCAACGATGCAGACCGTT	杆状病毒表达 Baculovirus expression
eCTL6-R	ATGACCTCCTCCATGCTCATCATCACAC	
eCTL6-R1	ATGCGGCCGCTTAATGGTGATGGTGATGATGACCTCCTCC	

1.4　*CTL6* 基因序列的生物信息学分析

获得 *CTL6* 的 cDNA 序列后，利用 Bio Edit 软件搜索开放阅读框，并翻译成氨基酸序列。氨基酸序列的分析、分子量及等电点的预测，在 EXPASY (Expert Protein Analysis System, http://www.expasy.org)上完成。在 Signal 4.1 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)查找信号肽。在 SMART (http://smart.embl.de/)系统中预测 CTL6 的蛋白结构域。在 Clustal W2(http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)系统中比对氨基酸序列。借助 MEGA5 软件，根据 neighbor-joining 的方法(Tamura *et al*., 2007)构建系统发育树。

1.5　*CTL6* 表达模式分析

为了研究 *CTL6* 的时空表达模式，从亚洲玉米螟产卵开始，分别收集卵、1-5 龄第 0 天幼虫、蛹，以及 5 龄幼虫的头、中肠、脂肪体、总血细胞等组织。此外，还选取亚洲玉米螟 5 龄第 0 天尚未取食的幼虫，注射 2 μL 无菌 1 × PBS (phosphate buffered saline)用作对照；注射 5×10^3 个/μL 灭活的大肠杆菌菌液，或 5 μg/μL 的灭活藤黄微球菌 *Micrococcus luteus* 菌液，或 3×10^4 个/μL 球孢白僵菌的分生孢子液作为处理。注射后正常喂食，20 h 后收集幼虫。然后按照第 1.3 节所述的方法获得所取材料的总 RNA 并合成 cDNA。然后采用半定量 RT-PCR 的方法，检测 *CTL6* 基因在样品中的转录水平，亚洲玉米螟核糖体蛋白 L8 基因(*rpL8*)被用作内参，所用引物见表 1。PCR 扩增反应条件为：94℃ 预变性 3 min；94℃ 变性 30 s，55℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 30 s，28 个循环；72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测并拍照。

1.6　利用原核表达系统产生 CTL6 重组蛋白

为了获得 CTL6 重组蛋白，设计引物(表 1)，通过 PCR 扩增获得编码成熟 CTL6 蛋白的目的基因片段。将 PCR 产物纯化后连接到 pMD19-T 载体(TaKaRa, Japan)，测序正确后，经 *Nco*I 和 *Not*I 双酶切，再连入经同样酶切的 pET28a 表达载体(Novagen, USA)中。将构建好的表达载体转入大肠杆菌 BL21 (DE3)感受态细胞。参照 Chu 等(2015a)的方法进行蛋白表达。表达的蛋白样品经 12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测。

1.7　利用 Bac-to-Bac® 杆状病毒表达系统产生 CTL6 重组蛋白

以 1.3 节中构建好的测序质粒为模板，在开放读码框架外设计特异性引物(表 1)，通过 PCR 扩增含有信号肽部分的 *CTL6* 全长序列。测序正确后经 *BamH*I 和 *Not*I 双酶切，连入经同样酶切的 pFastBac1 载体(Invitrogen, USA)。转化后提取质粒，进一步转入大肠杆菌 DH10Bac 感受态细胞中获得 Bacmid 大质粒。再利用细胞转染试剂 Cellfectin II Reagent 将大质粒转入草地夜蛾 *Spodoptera frugiperda* Sf9 真核细胞。再用 Bac-to-Bac® 杆状病毒表达系统(Invitrogen, USA)进行后续重组蛋白表达。然后利用镍-琼脂糖凝胶(Ni-NTA)参照 Chu 等(2015a)的方法从无血清细胞培养基中纯化 CTL6

重组蛋白，并在缓冲液（20 mmol/L Tris，100 mmol/L NaCl，pH 8.0）中透析过夜。经聚丙烯酰胺凝胶电泳检测纯度后，分装，于 -80℃保存备用。

1.8 重组蛋白对大肠杆菌凝集能力的分析

为了检测 CTL6 重组蛋白对大肠杆菌的凝集作用，首先按照 Tian 等（2009）的方法用吖啶橙标记大肠杆菌 DH5α，然后将标记的大肠杆菌悬浮于含 2 mmol/L $CaCl_2$ 的 TBS 缓冲液（25 mmol/L Tris-HCl，137 mmol/L NaCl，3 mmol/L KCl，pH 7.0）中，使得细菌浓度为 1×10^6 个/μL。取 10 μL 菌液置于 96 孔板中，然后加入 1.7 节中得到的纯化 CTL6 蛋白（用上述 TBS 缓冲液将 CTL6 蛋白稀释至终浓度分别为 10，30 和 40 μg/mL，同时将终浓度为 40 μg/mL 的牛血清白蛋白（bovine serum albumin，BSA）和亚洲玉米螟酚氧化酶原重组蛋白（Chu *et al.*，2015b）用作对照。室温放置 45 min 后，取 5 μL 制片，于荧光显微镜（EVOS 荧光倒置显微镜，美国 AMG 公司）下观察并拍照。

2 结果

2.1 亚洲玉米螟 *CTL6* 基因全长序列的获得与分析

通过对亚洲玉米螟转录组数据进行初步分析（Liu *et al.*，2014），本研究确定了以 *CTL6* 为研究对象。为了研究该基因的功能，我们首先通过 PCR 技术获得了该基因的全长序列。测序结果表明所获得的 *CTL6* 基因 cDNA 序列全长为 1 034 nt（图 1），其中包含 945 nt 的完整开放阅读框。该序列共编码 314 个氨基酸残基，其中 40 个为酸性氨基酸，40 个为碱性氨基酸。翻译的氨基酸序列 N 端含 22 个氨基酸残基组成的信号肽，推测 CTL6 是一个分泌蛋白，合成后可能分泌到淋巴液中行使功能。预测其分子量约为 33.0 kDa，等电点为 5.42。

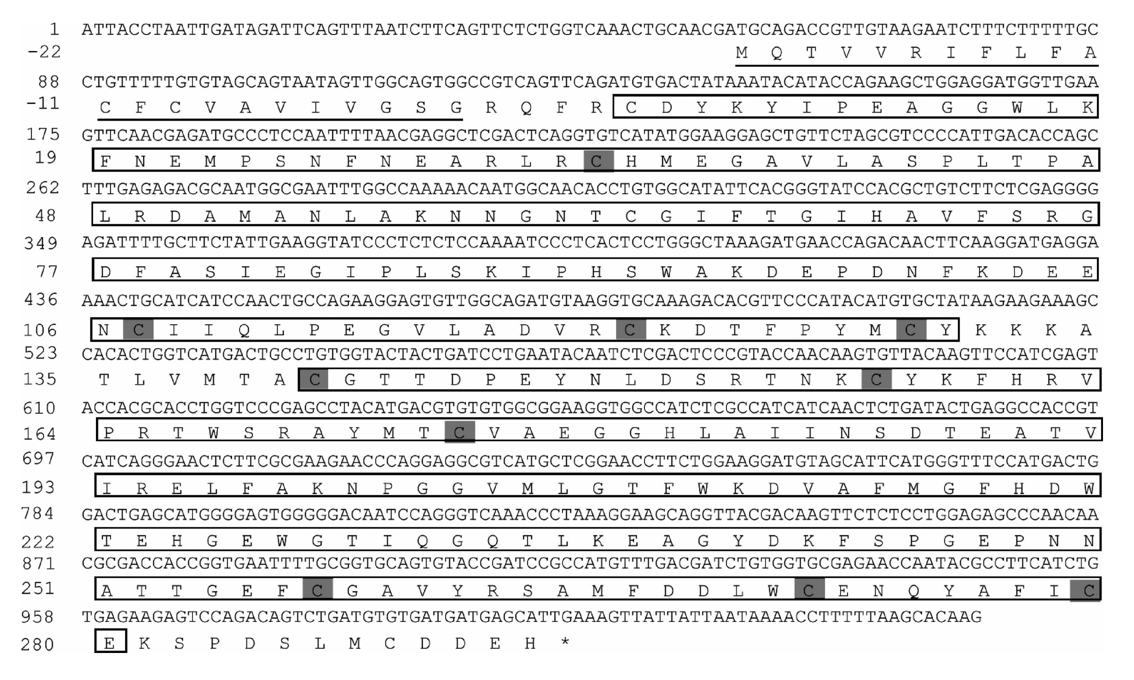


图 1 亚洲玉米螟 *CTL6* 基因全长 cDNA 序列及氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequence and amino acid sequences of *CTL6* from *Ostrinia furnacalis*

信号肽序列用横线标注；保守的半胱氨酸残基用灰色阴影标注；糖识别结构域用方框标注。Amino acid residues in the signal peptide are marked with underline; conserved cysteine residues are marked with gray shadow; carbohydrate recognition domains are marked with box.

2.2 亚洲玉米螟 *CTL6* 基因的生物信息学分析结果

利用 SMART 软件对亚洲玉米螟 *CTL6* 编码的氨基酸序列分析表明，亚洲玉米螟 CTL6 的氨基酸序列与鳞翅目其他昆虫体内已发现的 C 型凝集素类似，含有两个串联的糖识别结构域（CRD1 和 CRD2）。两个糖识别结构域分别含有 126 和 140 个氨基酸残基，且两个糖识别结构域分别包括 4 和 6 个保守的半胱氨酸残基（图 1 和图 2）。将新鉴定的 CTL6 氨基酸序列与 28 个其他昆虫来源的已知 C 型凝集素氨基酸序列进行同源比对（附图 1）。所构建的系统发育树（图 3）表明：亚洲玉米螟 CTL6 与烟草天蛾和家蚕的 C 型

凝集素聚合成了一个分支，且与烟草天蛾的 IML-2 同源性最高，说明亚洲玉米螟 CTL6 与烟草天蛾 IML-2 在进化上亲缘关系最接近，可能具有和烟草天蛾 IML-2 类似的促进大肠杆菌凝集的功能。

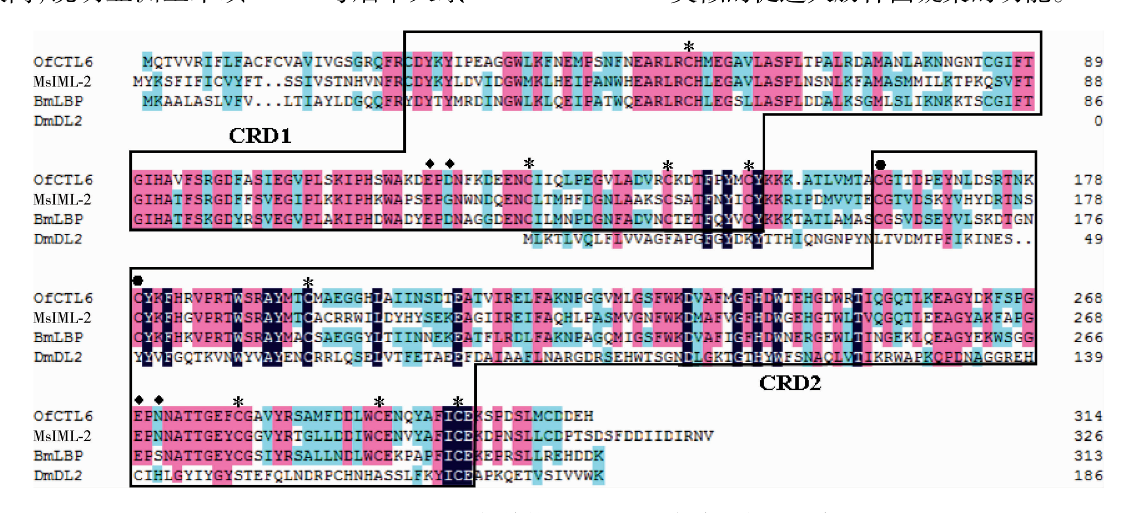


图 2　亚洲玉米螟 CTL6 与其他 3 种 C 型凝集素的氨基酸序列比对

Fig. 2　Alignment of amino acid sequences between *Ostrinia furnacalis* CTL6 and three other C-type lectins

CRD 中的保守半胱氨酸残基上方用星号标注；决定结合特异性的两个关键氨基酸残基上方用菱形标注。The conserved cysteine residues in CRD are indicated by the asterisk, and the two amino acid residues that are the most important for the determination of ligand binding specificity are marked by diamond.

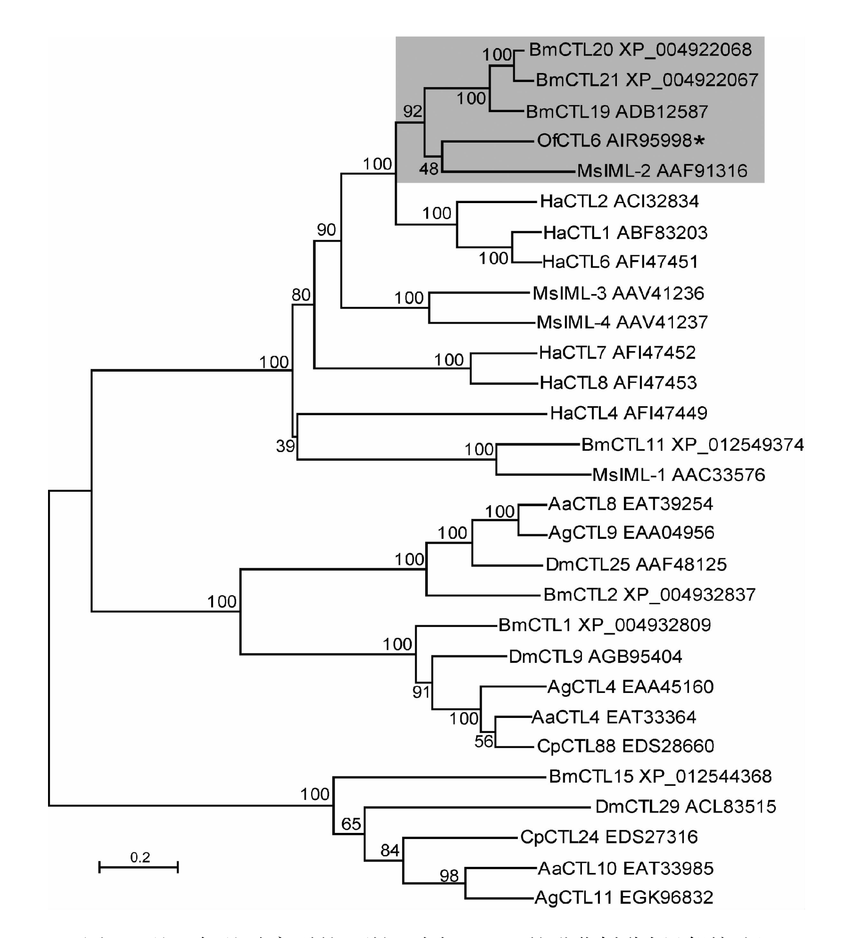


图 3　基于氨基酸序列的亚洲玉米螟 CTL6 的进化树分析（邻接法）

Fig. 3　Phylogenetic analysis of CTL6 from *Ostrinia furnacalis* based on amino acid sequence (neighbor-joining method)

Aa：埃及伊蚊 *Aedes aegypti*；Ag：*Anopheles gambiae*；Bm：家蚕 *Bombyx mori*；Cp：致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*；Dm：黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*；Ha：棉铃虫 *Helicoverpa armigera*；Ms：烟草天蛾 *Manduca sexta*；Of：亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis*. 图中序列名称后为该基因的 GenBank 登录号。The number after the gene name is the GenBank accession number.

2.3 亚洲玉米螟 CTL6 基因在不同龄期、不同组织及不同病原物诱导下的转录水平存在差异

CTL6 基因在玉米螟 5 龄幼虫期的转录水平最高，卵期其次，在蛹期也可检测到微弱的转录（图 4：A）。*CTL6* 在不同组织内的转录水平也不尽相同，其中在脂肪体内转录水平最高，其次是头部，然后是中肠，在淋巴液离心获得的总血细胞内的转录水平最低（图 4：B）。此外，亚洲玉米螟幼虫分别感染大肠杆菌、藤黄微球菌或球孢白僵菌后，*CTL6* 的转录水平均明显增加，且藤黄微球菌和球孢白僵菌的诱导效果更好（图 4：C）。这表明 *CTL6* 在亚洲玉米螟体内呈诱导性表达。

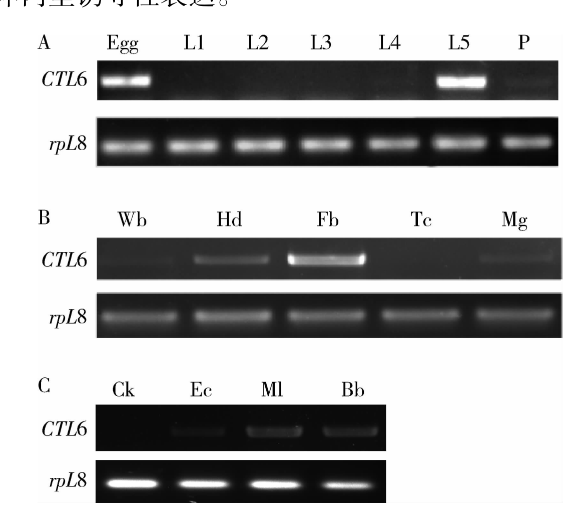


图 4 亚洲玉米螟 *CTL6* 基因在不同龄期（A）、5 龄幼虫不同组织（B）及不同病原物诱导下 5 龄幼虫体内（C）的表达模式

Fig. 4 Expression profiles of *CTL6* in different developmental stages (A), different tissues of the 5th instar larvae (B) and the 5th instar larvae under different pathogen induction (C) from *Ostrinia furnacalis*

Egg：卵 Egg；L1：1 龄幼虫 1st instar larva；L2：2 龄幼虫 2nd instar larva；L3：3 龄幼虫 3rd instar larva；L4：4 龄幼虫 4th instar larva；L5：5 龄幼虫 5th instar larva；P：蛹 Pupa；Wb：全身 Whole body；Hd：头 Head；Fb：脂肪体 Fat body；Tc：总血细胞 Total blood cells；Mg：中肠 Midgut；Ck：磷酸盐缓冲液 Phosphate buffered saline；Ec：大肠杆菌 *Escherichia coli*；Ml：藤黄微球菌 *Micrococcus luteus*；Bb：球孢白僵菌 *Beauveria bassiana*.

2.4 利用原核表达系统产生了不溶的 CTL6 重组蛋白

为了研究亚洲玉米螟 CTL6 蛋白的可能功能，我们首先尝试利用简单的原核表达系统获得可用的重组蛋白。SDS-PAGE 分析结果显示：异丙基硫代半乳糖苷（IPTG）诱导后，33 kDa 左右有一条表达量明显增加的特异条带，和预期的 CTL6 重组蛋白分子量大小完全一致（图 5）。但是，将收集的菌体超声裂解后，原核表达系统获得的 CTL6 重组蛋白几乎全部在包涵体中，为不可溶蛋白（图 5，第 4 泳道）。我们曾试图对该不溶蛋白进行复性，多次尝试后仍然无法得到可溶的 CTL6 重组蛋白，故原核表达系统产生的这部分蛋白不能用于后续的功能分析，仅拟用于产生特异的 CTL6 抗体。

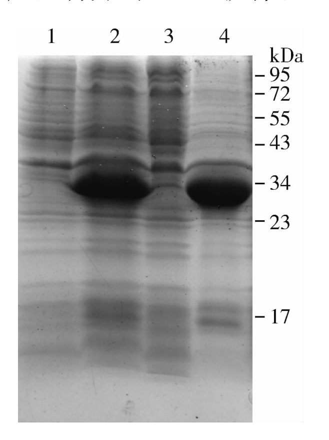


图 5 SDS-PAGE 检测原核表达系统来源的 CTL6 重组蛋白

Fig. 5 SDS-PAGE detection of the recombinant CTL6 produced in the prokaryotic system

1：诱导前样品 Pre-induced sample；2：诱导后样品 Induced sample；3：可溶组分 Soluble fraction；4：不溶组分 Insoluble fraction.

2.5 利用真核表达系统产生并纯化了可溶的 CTL6 重组蛋白

鉴于原核表达系统获得的 CTL6 重组蛋白高级结构可能不正确，我们又利用了真核 Bac-to-Bac® 杆状病毒表达系统产生了重组 CTL6 蛋白。亚洲玉米螟 CTL6 利用自身的信号肽，分泌到了胞外的昆虫细胞培养基中。借助添加在 CTL6 重组蛋白羧基端的 6 × His 的序列标签，我们用镍-琼脂糖凝胶对其进行了纯化。SDS-PAGE 结果（图 6：A）显示，纯化得到的重组蛋白分子量约为 42 kDa，比预期分子量（33.9 kDa）略高。电泳结果还表明本实验获得的重组蛋白在主带下面还有一条很微弱的带，可能是纯化过程中的降解所致。Image J 软件分析结果显示代表 CTL6 重组蛋白的主带亮度占总蛋白的 80.1%，表明我们获得的重组 CTL6 蛋白纯度可以用于后续的功能鉴定。Western blot 分析结果（图 6：B）显示主带下面的微弱带也能被 Anti-His 抗体识别，而 6 × His 的序列标签被人为加在重组 CTL6 蛋白的羧基端，故表明降解发生在蛋白的氨基端。

2.6 CTL6 重组蛋白对大肠杆菌有凝集作用

将真核表达系统来源的纯化 CTL6 重组蛋白加

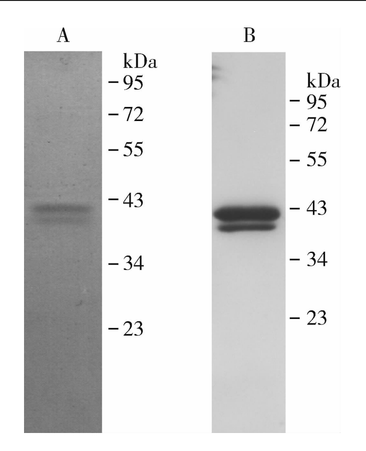


图 6 SDS-PAGE 检测真核表达系统来源的 CTL6 重组蛋白

Fig. 6 SDS-PAGE detection of the purified recombinant CTL6 produced in Bac-to-Bac® baculovious system

A：考马斯亮蓝染色 Coomassie Brilliant Blue staining；B：Western blot 分析，Anti-His 用作一抗 Western blot assay with Anti-His as the primary antibody.

入到经吖啶橙标记大肠杆菌中，结果发现：相对于牛血清白蛋白 BSA 的对照，加入 CTL6 后，大肠杆菌的凝集明显增多（图 7）。并且该凝集的增多是 CTL6 浓度依赖性的，当 CTL6 的终浓度为 10 μg/mL 时，无可见的凝集现象；当 CTL6 终浓度增至 30 μg/mL 时，对大肠杆菌开始出现可见的凝集作用；在所测试的浓度范围内，当 CTL6 的终浓度为 40 μg/mL 时，凝集作用最为明显（图 7）。此外，当浓度为 40 μg/mL 时，羧基端同样带有 His 标签的亚洲玉米螟酚氧化酶原重组蛋白（Chu *et al*., 2015b）加至大肠杆菌时，无可见凝集作用发生，说明 CTL6 重组蛋白中的 His 标签对凝集作用无任何影响，图 7 中观察到的 CTL6 重组蛋白促进大肠杆菌的凝集是由 CTL6 本身的功能引起的。

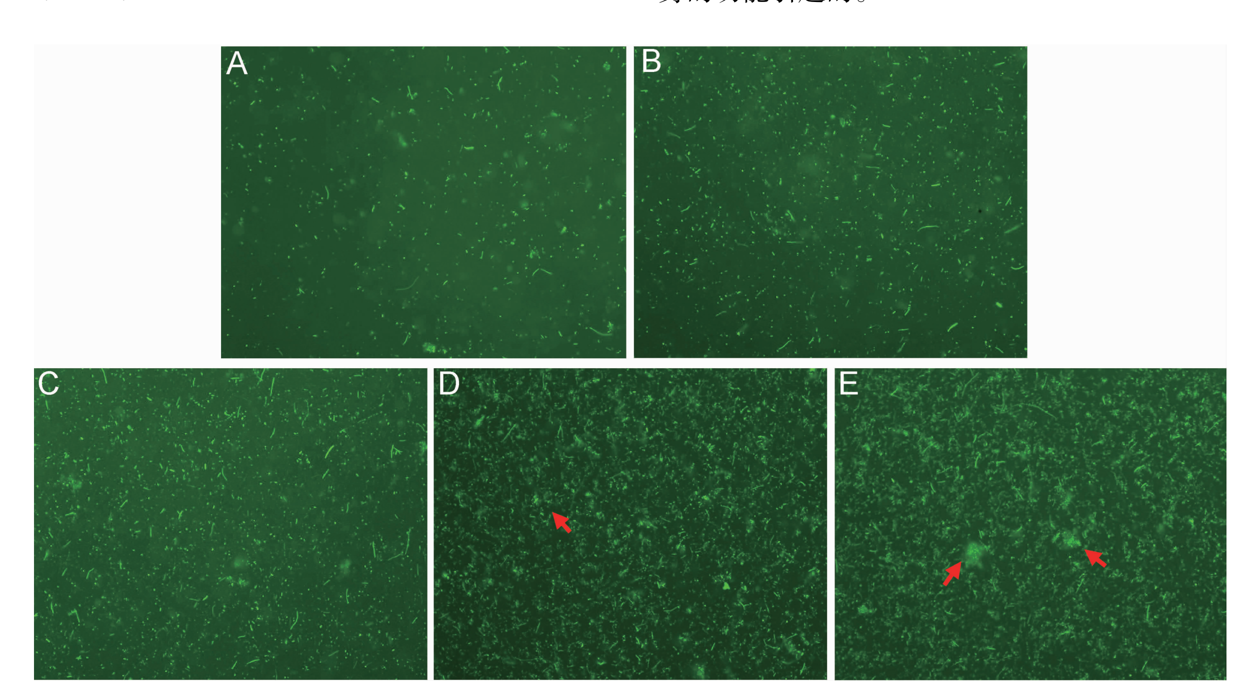


图 7 CTL6 对大肠杆菌的凝集作用

Fig. 7 Agglutination of *Escherichia coli* by *Ostrinia furnacalis* CTL6

A：40 μg/mL BSA + *Escherichia coli*；B：40 μg/mL PPO + *E. coli*；C：10 μg/mL CTL6 + *E. coli*；D：30 μg/mL CTL6 + *E. coli*；E：40 μg/mL CTL6 + *E. coli*. BSA：牛血清白蛋白 Bovine serum albumin；PPO：酚氧化酶原重组蛋白 Prophenoloxidase. 大肠杆菌的聚集作用用红色箭头标注。Agglutination of *E. coli* was indicated by the red arrow.

3 讨论

C 型凝集素作为昆虫模式识别蛋白家族中的重要成员，在昆虫对外源物的识别过程中发挥着重要作用。本研究首次在亚洲玉米螟中克隆到了 *CTL6* 基因的全长 cDNA 序列，该基因编码的氨基酸序列含有两个串联的糖识别结构域（CRD1 和 CRD2）。包括烟草天蛾 IML-2、美国白蛾 *Hyphantria cunea* 凝集素（lectin）和家蚕凝集素（immulectin）在内的鳞翅目昆虫 C 型凝集素也都含有两个这样的糖识别结构域（Shin *et al*, 1998；Koizumi *et al*., 1999；Yu, 2000），但是果蝇 DL-1 ~ DL-3 在内的双翅目昆虫的 C 型凝集素中只含有 CRD2，缺乏 CRD1（Ao *et al*., 2007）。据报道单个的 CRD 对糖基有弱的亲和性，并且哺乳动物 C 型凝集素寡聚体间的共价相互作

用负责它们与病原体表面结合(Weis *et al.*, 1998)。亚洲玉米螟 CTL6 有两个 CRD,可能能够增强这种结合力。此外,尽管所有 C 型凝集素的 CRD 都有相似的氨基酸序列,例如保守的疏水氨基酸残基和 4 个不变的半胱氨酸残基,但是根据 CRD 的序列长短可分为“短型”和“长型”两种 CRD 类型。其中短型 CRD 含有约 115 个氨基酸残基,长型 CRD 含有约 130 个氨基酸残基且氨基端多出一个半胱氨酸残基形成的二硫键(Drickamer, 1993; Day, 1994)。亚洲玉米螟 CTL6 的 CRD1 属于短型,而 CRD2 属于长型,CRD2 中额外的两个半胱氨酸残基是 Cys163 和 Cys179。CTL6 中还包含一个由 41 个氨基酸残基组成的拓展环(FMGFHDWTEHGDWRTIQGQTLKEAGYDKFSPGEPNNATTGE),该拓展环也存在于烟草天蛾 IML-2 和巨噬细胞甘露糖受体(macrophage mannose receptor)CRD4 中(East and Isacke, 2002)。已知烟草天蛾 IML-2 中的拓展环有增强配体结合刺激酚氧化酶原激活的能力,亚洲玉米螟 CTL6 中的拓展环是否也有类似的功能还不可知,这也是我们下一步要研究的课题。

鼠甘露糖结合蛋白 A(rat mannose-binding protein A, MBP-A)的 CRD 晶体结构显示 CRD 中的一个钙离子结合位点和两个关键的氨基酸残基 Glu185 和 Asn187(Weis *et al.*, 1992)。MBP-A 中的谷氨酸 Glu 和天冬酰胺 Asn 通过与甘露糖上的 3-OH 和 4-OH 形成氢键来决定 CRD 的结合特异性。相同位置上是 Glu 和 Asn 残基的 CRD 可与甘露糖或者葡萄糖相互作用,而该位置上是谷氨酰胺 Gln 和天冬氨酸 Asp 则结合半乳糖(Drickamer, 1993; Day, 1994)。亚洲玉米螟 CTL6 中的 CRD1 和 CRD2 中这两个位置的氨基酸残基分别为 Glu119 和 Asp121 及 Glu269 和 Asn271。这暗示着亚洲玉米螟的 CTL6 可能也有结合甘露糖或者葡萄糖的特性。据文献报道,C 型凝集素与病原体细胞表面的糖基结合后可引起病原体的凝集从而杀死或清除病原体的感染(Ling and Yu, 2006; Xu *et al*, 2010; Zhang *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2014)。我们把真核表达系统来源的亚洲玉米螟重组 CTL6 蛋白在体外与大肠杆菌混合时,的确观察到 CTL6 的加入可以导致大肠杆菌的凝集,且该凝集作用是浓度依赖性的。这表明本研究鉴定到的亚洲玉米螟 CTL6 是一种典型的 C 型凝集素,对大肠杆菌有一定的凝集能力,这也与生物信息学分析结果是一致的。CTL6 在亚洲玉米螟体内作为一种模式识别受体,参与了该害虫的天然免疫应答过程,促进大肠杆菌的凝集。

综上所述,本研究鉴定并验证出一种新的 C 型凝集素 CTL6,克隆了其全长 cDNA 序列,分析了其时空和诱导表达模式,并利用多种表达系统获得了纯化的重组蛋白。重组 CTL6 蛋白在体外对大肠杆菌有一定的凝集作用,表明 CTL6 参与了亚洲玉米螟对病原物的天然免疫反应。本研究结果为进一步探索 CTL6 在亚洲玉米螟天然免疫过程的功能和作用机制奠定了基础,相关研究工作正在深入进行之中。

参考文献(References)

Ao J, Ling E, Yu XQ, 2007. *Drosophila* C-type lectins enhance cellular encapsulation. *Mol. Immunol.*, 44(10): 2541–2548.

Chai LQ, Tian YY, Yang DT, Wang JX, Zhao XF, 2008. Molecular cloning and characterization of a C-type lectin from the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Dev. Comp. Immunol.*, 32(1): 71–83.

Cherry S, Silverman N, 2006. Host-pathogen interactions in *Drosophila*: new tricks from an old friend. *Nat. Immunol.*, 7(9): 911–917.

Chu Y, Liu Y, Shen D, Hong F, Wang G, An C, 2015a. Serine proteases SP1 and SP13 mediate the melanization response of Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*, against entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.*, 128(6): 64–72.

Chu Y, Zhou F, Liu Y, Hong F, Wang G, An C, 2015b. *Ostrinia furnacalis* serpin-3 regulates melanization cascade by inhibiting a prophenoloxidase-activating protease. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 61(3): 53–61.

Day AJ, 1994. The C-type carbohydrate recognition domain (CRD) superfamily. *Biochem. Soc. Trans.*, 22(1): 83–88.

Drickamer K, 1993. Ca^{2+}-dependent carbohydrate-recognition domains in animal proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 3(3): 393–400.

East L, Isacke CM, 2002. The mannose receptor family. *Biochim. Biophys. Acta*, 1572(2–3): 364–386.

Haq S, Kubo T, Kurata S, Kobayashi A, Natori S, 1996. Purification, characterization, and cDNA cloning of a galactose-specific C-type lectin from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.*, 271(33): 20213–20218.

Hughes AL, 2012. Evolution of the βGRP/GNBP/β-1, 3-glucanase family of insects. *Immunogenetics*, 64(7): 549–558.

Jiang H, Vilcinskas A, Kanost MR, 2010. Immunity in lepidopteran insects. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 708: 181–204.

Jiang H, Wang Y, Yu XQ, Kanost MR, 2003. Prophenoloxidase-activating proteinase-2 from hemolymph of *Manduca sexta*. A bacteria-inducible serine proteinase containing two clip domains. *J. Biol. Chem.*, 278(6): 3552–3561.

Jin XK, Li S, Guo XN, Cheng L, Wu MH, Tan SJ, Zhu YT, Yu AQ, Li WW, Wang Q, 2013. Two antibacterial C-type lectins from crustacean, *Eriocheir sinensis*, stimulated cellular encapsulation in vitro. *Dev. Comp. Immunol.*, 41(4): 544–552.

Kingsolver MB, Hardy RW, 2012. Making connections in insect innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(46): 18639 – 18640.

Koizumi N, Imamura M, Kadotani T, Yaoi K, Iwahana H, Sato R, 1999. The lipopolysaccharide-binding protein participating in hemocyte nodule formation in the silkworm *Bombyx mori* is a novel member of the C-type lectin superfamily with two different tandem carbohydrate-recognition domains. *FEBS Lett.*, 443(2): 139 – 143.

Ling E, Yu XQ, 2006. Cellular encapsulation and melanization are enhanced by immulectins, pattern recognition receptors from the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Dev. Comp. Immunol.*, 30(3): 289 – 299.

Liu Y, Shen D, Zhou F, Wang G, An C, 2014. Identification of immunity-related genes in *Ostrinia furnacalis* against entomopathogenic fungi by RNA-seq analysis. *PLoS ONE*, 9(1): e86436.

Ning YY, You MS, Wang CS, 2009. Advances in the mechanisms of insect immune recognition and pathogen immune escape. *Acta Entomologica Sinica*, 52(5): 567 – 575. [宁媛媛，尤民生，王成树，2009. 昆虫免疫识别与病原物免疫逃避机理研究进展. 昆虫学报，52(5): 567 – 575]

Shi XZ, Kang CJ, Wang SJ, Zhong X, Beerntsen BT, Yu XQ, 2014. Functions of *Armigeres subalbatus* C-type lectins in innate immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 52: 102 – 114.

Shin SW, Park SS, Park DS, Kim MG, Kim SC, Brey PT, Park HY, 1998. Isolation and characterization of immune-related genes from the fall webworm, *Hyphantria cunea*, using PCR-based differential display and subtractive cloning. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28(11): 827 – 837.

Song YY, Zhou DR, He KL, 1999. Studies on mass rearing of Asian corn borer: development of a satisfactory non-agar semi-artificial diet and its use. *Acta Phytophylacica Sinica*, 26(4): 324 – 328. [宋彦英，周大荣，何康来，1999. 亚洲玉米螟无琼脂半人工饲料的研究与应用. 植物保护学报，26(4): 324 – 328]

Takase H, Watanabe A, Yoshizawa Y, Kitami M, Sato R, 2009. Identification and comparative analysis of three novel C-type lectins from the silkworm with functional implications in pathogen recognition. *Dev. Comp. Immunol.*, 33(6): 789 – 800.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24(8): 1596 – 1599.

Tanji T, Ohashi-Kobayashi A, Natori S, 2006. Participation of a galactose-specific C-type lectin in *Drosophila* immunity. *Biochem. J.*, 396(1): 127 – 138.

Tian YY, Liu Y, Zhao X, Wang JX, 2009. Characterization of a C-type lectin from the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Dev. Comp. Immunol.*, 33(6): 772 – 779.

Watanabe A, Miyazawa S, Kitami M, Tabunoki H, Ueda K, Sato R, 2006. Characterization of a novel C-type lectin, *Bombyx mori* multibinding protein, from the *B. mori* hemolymph: mechanism of wide-range microorganism recognition and role in immunity. *J. Immunol.*, 177(7): 4594 – 4604.

Weis WI, Drickamer K, Hendrickson WA, 1992. Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. *Nature*, 360(6400): 127 – 134.

Weis WI, Taylor ME, Drickamer K, 1998. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol. Rev.*, 163: 19 – 34.

Xu WT, Wang XW, Zhang XW, Zhao XF, Yu XQ, Wang JX, 2010. A new C-type lectin (FcLec5) from the Chinese white shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Amino Acids*, 39(5): 1227 – 1239.

Yu XQ, Gan H, Kanost MR, 1999. Immulectin, an inducible C-type lectin from an insect, *Manduca sexta*, stimulates activation of plasma prophenol oxidase. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29(7): 585 – 597.

Yu XQ, Kanost MR, 2000. Immulectin-2, a lipopolysaccharide-specific lectin from an insect, *Manduca sexta*, is induced in response to gram-negative bacteria. *J. Biol. Chem.*, 275(48): 37373 – 37381.

Yu XQ, Kanost MR, 2004. Immulectin-2, a pattern recognition receptor that stimulates hemocyte encapsulation and melanization in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev. Comp. Immunol.*, 28(9): 891 – 900.

Yu XQ, Ling E, Tracy ME, Zhu Y, 2006. Immulectin-4 from the tobacco hornworm *Manduca sexta* binds to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid. *Insect Mol. Biol.*, 15(2): 119 – 128.

Yu XQ, Ma Y, 2006. Calcium is not required for Immulectin-2 binding, but protects the protein from proteinase digestion. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36(6): 505 – 516.

Yu XQ, Tracy ME, Ling E, Scholz FR, Trenczek T, 2005. A novel C-type immulectin-3 from *Manduca sexta* is translocated from hemolymph into the cytoplasm of hemocytes. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35(4): 285 – 295.

Zhang MM, Chu Y, Zhao ZW, An CJ, 2012. Progress in the molecular mechanisms of the innate immune responses in insects. *Acta Entomologica Sinica*, 55(10): 1221 – 1229. [张明明，初源，赵章武，安春菊，2012. 昆虫天然免疫反应分子机制研究进展. 昆虫学报，55(10): 1221 – 1229]

Zhang XW, Ren Q, Zhang HW, Wang KK, Wang JX, 2013. A C-type lectin could selectively facilitate bacteria clearance in red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(5): 1387 – 1394.

（责任编辑：袁德成）